

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-238686

(43)Date of publication of application : 16.09.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 A61K 48/00
 C07H 21/04
 C12N 1/21
 C12P 21/02
 C12P 21/08
 C12Q 1/02
 G01N 33/566
 // A61K 39/395
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)
 (C12P 21/08
 C12R 1:91)

(21)Application number : 08-050678

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 07.03.1996

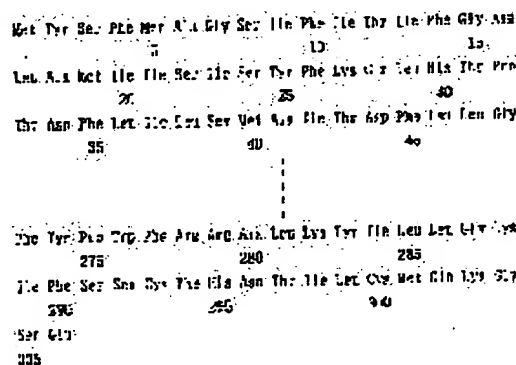
(72)Inventor : HINUMA KUNIIJI
FUJII AKIRA

(54) NEW G-PROTEIN CONJUGATED TYPE RECEPTOR PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new protein having a specific amino acid sequenced, being a G-protein conjugated type receptor derived from human stomach or small intestine, and useful as e.g. a reagent for developing receptor binding assay system or screening compounds proposed for a medicine.

SOLUTION: This protein is a new G-protein conjugated type receptor protein (salt) having an amino acid sequence identical with or essentially identical with an amino acid sequence of the formula, and a useful as e.g. a reagent for developing receptor binding assay system or screening compounds proposed for a medicine; the DNA of this protein is useful for the drug design based on the comparison with structurally similar ligand receptors, as a probe in gene diagnoses, PCR primer, etc. This protein is obtained by the following process: a human stomach-derived cDNA synthesized from the corresponding human stomach-derived mRNA is amplified by PCR process using a primer consisting of part of the base sequence of the cDNA to effect cloning, and the resultant gene is then integrated into a vector and expressed in host cells.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-238686

(43) 公開日: 平成9年(1997)9月16日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/09	ZNA	9282-4B	C12N 15/00	ZNA A
A61K 48/00	AED		A61K 48/00	AED
C07H 21/04			C07H 21/04	B
C12N 1/21			C12N 1/21	
C12P 21/02			C12P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全31頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-50678

(22) 出願日 平成8年(1996)3月7日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ1402号

(72) 発明者 藤井 亮

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ303号

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57) 【要約】

【課題】 レセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング等における試薬として用いることができる新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】 本発明のヒト胃、小脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAは、レセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができる。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをより効率的に単離するための合成DNAプライマーを用いてヒト胃またはヒト小脳由来のcDNAをPCR法により増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするヒト由来のcDNAを単離し、その構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の部分的な相同性が認められたことから、ヒトの細胞で発現機能している新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見から、これらのDNAを用いれば、該レセプター蛋白質を製造することもできることを見いだした。さらに、本発明者らは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害するあるいは促進させる化合物のスクリーニングを行なうこともできることを見いだした。

【 0 0 0 7 】これらの知見を基に、本発明者らはさらに鋭意研究した結果、本発明を完成した。本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、

(2) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、

(3) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または上記(2)項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(4) 配列番号：2で表される塩基配列を有する上記

(3)項記載のDNA、

(5) 上記(3)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

(6) 上記(3)項記載のDNAまたは上記(5)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

(7) 上記(6)項記載の形質転換体を培養することを特徴とする上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、

(8) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩に対するリガンドの決定方法、

(9) (i) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と(ii) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を变化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

(10) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有してなる、リガンドと上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を变化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング用キット、および

(11) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体である。

20 【 0 0 0 8 】より具体的には、

(12) 蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1個または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、また配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、

30 (13) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

(14) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリー

る。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0013】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが挙げられる。具体的には、例えば第一膜貫通領域よりN末端側の部分や、第七膜貫通領域よりC末端側の部分あるいはこれらを除く第一から第七膜貫通領域までの部分などが用いられる。また、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。さらに具体的には、N末端から1個～4個のアミノ酸、C末端から1個～33個のアミノ酸や、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

【0014】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0015】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondelli, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher, s, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke, ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験 丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0016】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増幅することもできる。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0017】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローン化されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー

をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

【0022】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0023】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地【ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972】が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばパークホルダー (Burkholder) 最小培地【Bostian, K. L. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)】や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地【Bittler, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)】が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0024】宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たと

ば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地【サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)】, DMEM培地【ウイルス学 (Virology), 8巻, 396 (1959)】, RPMI 1640培地【ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519 (1967)】, 199培地【プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)】などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0025】より具体的には、後述の実施例6で得られる本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するプラスミドhBL5を、E. coli JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/phBL5を得る。得られたE. coli JM109/phBL5をLB培地（トリプトン 1%, イーストエキストラクト 0.5%, NaCl 0.5%）にアンピシリン 50 µg/mlを添加した培地に懸濁し、37℃で10~20時間培養することにより、ヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させる。

【0026】上記培養物からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりG蛋白質共役型レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気

ガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0032】④試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および⑤試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0033】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いて

もよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

【0034】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

【0035】細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^4$ 分子であるのが好ましく、 $10^4 \sim 10^5$ 分子であ

の。孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

② G 蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させた CHO 細胞を、12穴プレートに 5×10^4 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

【0040】③ 標識試験化合物

市販の [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^3S] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④ 非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

② 標識試験化合物を5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μl 加えておく。

③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1% SDS で溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体、脾臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine (IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTES など)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが挙げられる。

【0042】(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に体するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、

(イ) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 脳細胞などに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

【0043】本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするのである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

識したりガンドの該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法

、②標識したりガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したりガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したりガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0049】③標識したりガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したりガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したりガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{++} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

【0050】⑤本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合

と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{++} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0051】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するかどうかを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。

【0052】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約

ター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株（例えば、マウス脾臓β細胞株MIN6など）、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0057】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃

で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

【0058】②G蛋白質共役型レセプター標品
G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^4 個/穴で継代し、37℃、5% CO₂、95% air で2日間培養したものの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したリガンド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0059】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

② 10^{-3} ～ 10^{-10} Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識リガンドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent of Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0060】

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB: Percent of Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

【0061】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該G蛋白質共役型レセプターアゴニス

体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0065】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法【ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)】に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0066】抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、G蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地として

は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0067】(b)モノクローナル抗体の精製
抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 (例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法) に従って行われる。以上の(1)および(2)の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、(2)被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。

【0068】本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体 (以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある) を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えばG蛋白質共役型レセプター量) に対応した抗体、抗原もしくは

Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
[0073]	
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
[0074]	
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキ
サミド基	

- dNTP : デオキシリボヌクレオシド 5'-トリフォスフェート
- IP TG : イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド
- X-gal : 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド
- 【0075】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。
- 【配列番号：1】本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。
- 10 【配列番号：2】本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を示す。
- 【配列番号：3】実施例2で用いたプライマー r o - 5 i F 3 の配列を示す。
- 【配列番号：4】実施例2で用いたプライマー r o - 5 i R の配列を示す。
- 【配列番号：5】実施例4で用いたプライマー r o - 5 i R 2 の配列を示す。
- 【配列番号：6】実施例4で用いたプライマー r o - 5 i R 4 の配列を示す。
- 20 【配列番号：7】実施例5で用いたプライマー EM-L I の配列を示す。
- 【配列番号：8】実施例5で用いたプライマー r o - 5 i F 5 の配列を示す。
- 【配列番号：9】実施例5で用いたプライマー r o - 5 i F 6 の配列を示す。
- 【配列番号：10】実施例6で用いたプライマー BL 5 - 5 A の配列を示す。
- 【配列番号：11】実施例6で用いたプライマー BL 5 - A の配列を示す。
- 30 【配列番号：12】参考例4で得られた p u D - BL 5 に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質 c DNA断片にコードされるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。
- 【配列番号：13】参考例4で得られた p u D - BL 5 に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質 c DNA断片の塩基配列を示す。
- 【配列番号：14】参考例1において用いられた、ウサギ型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする c D N A のクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。
- 40 【配列番号：15】参考例1において用いられた、ウサギ型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする c D N A のクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。後述の実施例6で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) J M 1 0 9 / p h B L 5 は、平成8年2月13日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託番号 F E R M
- 50 B P - 5 3 9 2 として寄託されている。

Aプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、合成DNAプライマー（5'プライマー配列および3'プライマー配列）各100pM、0.25mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1μl および酵素に付属のバッファー1.0μlで、総反応溶液量は100μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60℃・3分のサイクルを25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

[0082]

【参考例4】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規レセプター候補クローンの選択

参考例3で行なったPCR後の反応産物は1.4%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、エレクトロエリユーション、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAKAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR^{II}へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell（宝酒造株式会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体を複数得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置PI-100（クラボウ社）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。

[0083]塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列を基に、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いてホモロジー検索を行なった結果、サブスタンスKレセプター蛋白質をコードするクローンが全体の約6割存在することが判明した。そこで、高頻度にクローニングされてくるサブスタンスKレセプター蛋白質のクローンを除くため、参考例3で得られたPCR産物を、制限酵素ApaIまたはBbsIで消化した。ApaIおよびBbsIは、ウサギサブスタンスKレセプター蛋白質をコードするDNAを切断するので該DNAを断片化させることができる。このようにしてサブスタンスKレセプター蛋白質をコードするDNAを除去した後、残ったPCR産物を上記の方法でクローニングし、塩基配列を決定した。これらを基に、上記

の方法でホモロジー検索を行った結果、形質転換体エリヒア・コリ（*Escherichia coli*）JM109/pu D-BL5の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を（図4）に示した。さらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後（図4）、疎水性プロット（図5）を行なった結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また、アミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行なった結果、例えば、ヒト由来ヒスタミンH₁レセプター蛋白質（JH0449）と32.6%、マウス由来β-アドレナリンレセプター蛋白質（S00260）と27.7%、ラット由来ドーパミンD₁レセプター蛋白質（S11378）と、28.8%、ヒト由来α1C-アドレナリンレセプター蛋白質（JN0765）と27.9%、マウス由来サブスタンスKレセプター蛋白質（S20303）と22.4%、ヒト由来μタイプオピオイドレセプター蛋白質（S41075）と24.4%のホモロジーを有する新規なレセプター蛋白質であることが判明した。上記の（ ）内の略語は、NBRF-PIR（National Biochemical Research Foundation-Protein Information Resource）にデータとして登録される際の整理番号であり、通常 Accession Number と呼ばれるものである。

[0084]実施例1

ヒト胃 poly(A)⁺RNAからのヒト胃由来cDNAの合成：ヒト胃 poly(A)⁺RNA（ニッポンジーン社）5μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（BRL社、米国）を加え、モロニマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（BRL社）によりヒト胃由来cDNAを合成した。得られたヒト胃由来cDNAをフェノール：クロロホルム（1：1）で抽出し、エタノール沈殿に付した後、50μlの蒸留水に溶解した。

[0085]実施例2

ヒト胃由来cDNAからPCR法によるヒト型G蛋白質共役型レセプターcDNA断片の増幅：実施例1で製造したヒト胃cDNA 0.5μlを鋳型とし、参考例4で得られたウサギ型G蛋白質共役型レセプターcDNA配列（プラスミドpDu-BL5に組込まれたDNA）の内の第2膜貫通領域付近と第5膜貫通領域付近の配列を参照して合成したプライマーro-5iF3（配列：5'-TCCTCCTGGGACTCATCATCATGC-3'、配列番号：3）およびプライマーro-5iR（配列：5'-AATCCCCACCATCACA GACCCAGGAGTGAAGA-3'、配列番号：4）を反応液中でそれぞれ200nMとなるようういて、PCR反応を行なった。該PCR反応においては、反応液はDNA polymerase EX Taq（宝酒造）を用

5'側配列とあわせてヒト型G蛋白質共役型レセプターの全アミノ酸配列(配列番号:1)の全コード領域を含むと考えられるゲノムDNAおよびcDNA由来の配列(配列番号:2)が得られた。塩基配列とそれがコードするアミノ酸配列を(図1)に示す。疎水性プロットを行なったところ、TM1~TM7で示す疎水性ドメインが存在することが確認された(図2)。

【0089】実施例6

ヒト小脳由来cDNAからPCR法を用いたcDNAの全コード領域を含むDNA断片の増幅:実施例4で製造したヒト小脳cDNAを鋳型として、ヒト小脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列をコードするcDNA断片の増幅を行った。まず実施例3で明らかとなったcDNAの配列を基に、プライマーBL5-5A(配列:5'-AGATCTCGAGGTGTCCGAGTGGCTATGTAT-3'配列番号:10)およびプライマーBL5-A(配列:5'-GCCTACTCACTTTCTTTTTCG-3'配列番号:11)を合成した。上記BL5-5Aは受容体cDNAのスタートコドンを含み、制限酵素XhoI部位を付加した-15~+6(スタートコドンATGのAを+1とする)に対応するセンス配列で、BL5-Aは受容体cDNAのストップコドンを含む+849~+869に対応するアンチセンス配列である。PCR反応は、実施例1において Marathon cDNA amplification kit により調製したcDNAをトリシン-EDTAバッファーで100倍に希釈したもの2.5μlを鋳型として、実施例2と同様の方法で反応液を調製し、94℃・1分、98℃・10秒、52℃・20秒、68℃・1分のサイクルを34回繰り返した。増幅産物を2%アガロース電気泳

配列

```

Met Tyr Ser Phe Met Ala Gly Ser Ile Phe Ile Thr Ile Phe Gly Asn
1           5           10           15
Leu Ala Met Ile Ile Ser Ile Ser Tyr Phe Lys Gln Leu His Thr Pro
20           25           30
Thr Asn Phe Leu Ile Leu Ser Met Ala Ile Thr Asp Phe Leu Leu Gly
35           40           45
Phe Thr Ile Met Pro Tyr Ser Met Ile Arg Ser Val Glu Asn Cys Trp
50           55           60
Tyr Phe Gly Leu Thr Phe Cys Lys Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Leu Met
65           70           75           80
Leu Ser Ile Thr Ser Ile Phe His Leu Cys Ser Val Ala Ile Asp Arg
85           90           95
Phe Tyr Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Leu Tyr Ser Thr Lys Ile Thr Ile
100          105          110
Pro Val Ile Lys Arg Leu Leu Leu Leu Cys Trp Ser Val Pro Gly Ala
115          120          125
Phe Ala Phe Gly Val Val Phe Ser Glu Ala Tyr Ala Asp Gly Ile Glu
130          135          140
Gly Tyr Asp Ile Leu Val Ala Cys Ser Ser Ser Cys Pro Val Met Phe

```

動に付し、エチジウムブロマイド染色し、約900bpのバンドを切り出し、実施例3と同様の方法でDNAを回収し、プラスミドベクターpCR¹¹IIへサブクローニングし、プラスミドp hBL5を得た。これを大腸菌JM109に導入し、Escherichia coli JM109/p hBL5を製造した。得られた形質転換体に挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果、このDNA断片はヒト型G蛋白質共役型レセプターcDNAの全コード領域(配列番号:1)を含む断片であることが分かった。

【0090】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に、G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0091】

【配列表】

【配列番号:1】

配列の長さ:306

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

47

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATCCCCACC ATCACAGACC CAG
GAGTGAA GA 32

【配列番号：5】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AACCTGCCAT AAACAAGGTG GTCC 24
【0096】

【配列番号：6】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTCCATCTG CATAGGCCTC TGAG 24
【0097】

【配列番号：7】

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGTCGAC TTATGCCCGA GAAGATGTTG AGCAA 35
【0098】

【配列番号：8】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

Ala Val Thr Asp Phe Leu Leu Gly Leu Ile Ile Met Pro Tyr Ser Met
1 5 10 15
Val Arg Ser Val Glu Asn Cys Trp Tyr Phe Gly Leu Ala Phe Cys Lys
20 25 30
Ile His Tyr Ser Phe Asp Leu Met Leu Ser Ile Thr Ser Ile Phe His
35 40 45
Leu Cys Ser Val Ala Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ile Cys Tyr Pro Leu
50 55 60
Arg Tyr Ser Thr Lys Met Thr Ile Pro Val Ile Lys Arg Leu Val Phe
65 70 75 80
Leu Cys Trp Ser Val Pro Gly Ala Phe Ala Phe Gly Val Val Phe Ser
85 90 95
Glu Ala Tyr Ala Asp Gly Ile Glu Gly Tyr Asp Thr Leu Val Ala Cys

48

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTATGATCAG ATCGGTGGAG AACTGCTGG 29
【0099】

【配列番号：9】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTATGTTGG TCGGTCCCTG GAGCATTTG 29
【0100】

【配列番号：10】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

20 配列

AGATCTCGAG GTGTCCGAGT GGCTATGTAT 30
【0101】

【配列番号：11】

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

30 GCCTACTCAC TTTCTTTTG C 21
【0102】

【配列番号：12】

配列の長さ：225

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

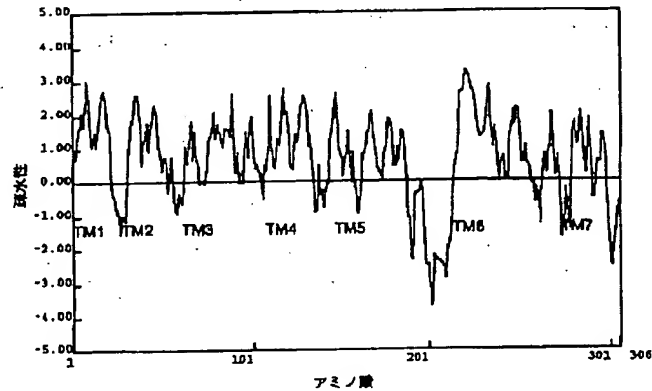
両者が同じ塩基配列である場合を示す。

〔図 4〕 参考例 4 で得られた、ウサギ胃幽門部平滑筋より PCR 増幅によって得た新規レセプター蛋白質 cDNA クローン p u D - B L 5 に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 cDNA 断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。PCR 増幅に用いた合成プライマーに相当する部分

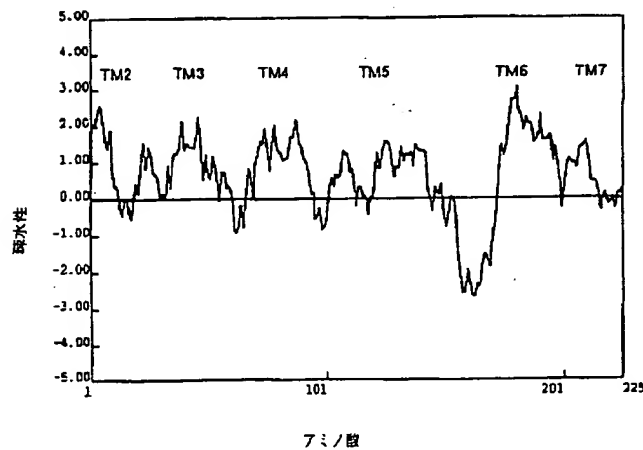
は除かれている。

〔図 5〕 参考例 4 で得られた、図 4 に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p u D - B L 5 に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 cDNA 断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図から TM 2 ~ TM 7 で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

〔図 2〕



〔図 5〕



[図 3]

```

1      10      20      30      40      50      60      70
5' TCCTCCTGGGATTACCATCATGCCATATAGTATGATCAGATCGGTGGAGAACTGCTGGTATTTTGGGCT
*****
21     30     40     50     60     70     80     90
71     80     90     100    110    120    130    140
TACATTTTGCAAGATTTATTATAGTTTGGACCTGATGCTTAGCATAACATCCATTTTTCATCTTTCCTCA
*****
91     100    110    120    130    140    150    160
TGCATTCTGCAAGATTCAITATAGTTTGGACTTGATGCTTAGCATAACATCCATTTTCCATCTTTCCTCA
*****
141    150    160    170    180    190    200    210
GTGGCCATTGATAGATTTTATGCTATATGTTACCCATTACTTTATCCACCAAATAACTATTCCAGTCA
*****
161    170    180    190    200    210    220    230
GTGGCCATTGATAGATTTTATGCTATCTGTTACCCCTTAAGATATTCCACCAAATGACGATCCCACTGA
*****
211    220    230    240    250    260    270    280
TTAAAGATTGCTACTTCTATGTTGGTCGGTCCCTGGAGCATTTCCTTCGGGGTGGTCTTCTCAGAGGC
*****
231    240    250    260    270    280    290    300
TTAAACGGTTGGTTTTTCTCTGCTGGTCAGTCCCTGGAGCCTTTGCATTGGCGTGGTTTTCTCGGAAGC
*****
281    290    300    310    320    330    340    350
CTATGCAGATGGAATAGAGGGCTATGACATCTTGGTTGCTTGTTCAGTTCCTGCCCAGTGATGTTCAAC
*****
301    310    320    330    340    350    360    370
CTATGCAGATGGAATAGAAGGCTATGATACTTGGTTGCTTGTTCAGCTCCTGCCCAGTGACGTTCAAC
*****
351    360    370    380    390    400
AAGCTATGGGGGACCACCTTGTTTATGGCAGGTTTCTTCACTCCTGGGTCTATGATGGT 3'
*****
371    380    390    400    410    420
AAGCTCTGGGGGACCACCTTGTTTATGGCAGGTTTCTTCACTCCTGGGTCTGTGATGGT 3'

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

21/08

21/08

C12Q 1/02

7823-4B

C12Q 1/02

G01N 33/566

G01N 33/566

// A61K 39/395

A61K 39/395

D

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12P 21/02

C12R 1:19)

(C12P 21/08

C12R 1:91)